

DEVICE AND METHOD FOR DETECTING PHOTOSYNTHESIS INHIBITION**Publication number:** WO03006684**Publication date:** 2003-01-23**Inventor:** KREISS WOLFGANG (DE); DREWES MARK WILHELM (DE); EBERZ GUENTHER (DE); CASPERS NORBERT (DE)**Applicant:** BAYER CROPSCIENCE AG (DE); KREISS WOLFGANG (DE); DREWES MARK WILHELM (DE); EBERZ GUENTHER (DE); CASPERS NORBERT (DE)**Classification:****- international:** C12Q1/02; G01N33/50; C12Q1/02; G01N33/50; (IPC1-7): C12Q1/02; C12M1/34**- european:** C12Q1/02B; G01N33/50F**Application number:** WO2002EP07057 20020626**Priority number(s):** DE20011033273 20010709**Also published as:**

WO03006684 (A3)

EP1407040 (A3)

EP1407040 (A2)

US2004178358 (A1)

EP1407040 (A0)

DE10133273 (A1)

less <<

Cited documents:

EP1134585

WO9919900

XP002219048

XP002219049

XP002162337

XP000428653

less <<

Report a data error here**Abstract of WO03006684**

A method, system and test strip for detecting photosynthesis inhibition in substances by providing cells or parts of cells with an intact photosystem, inserting said cells or cell parts into a planar layer, placing the test substance on the planar layer or inside the planar layer, exciting the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by an exciting light source, measuring the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by means of a detector and associating the detector signal with the degree of photosynthesis inhibition.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

05.3.08

SEARCH REPORT

4 / 4

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Januar 2003 (23.01.2003)(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/006684 A2

PCT

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/02,
C12M 1/34
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/07057
- (22) Internationales Anmeldedatum:
26. Juni 2002 (26.06.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 33 273.4 9. Juli 2001 (09.07.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER CROPSCIENCE AG [DE/DE]; Alfred-Nobel-Strasse 50, 40789 Monheim (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KREISS, Wolfgang [DE/DE]; Lortzingstr. 18, 51467 Bergisch Gladbach (DE). DREWES, Mark, Wilhelm [DE/DE]; Goethestr. 38, 40764 Langenfeld (DE). EBERZ, Günther [DE/DE]; Heiderhof 15, 51519 Odenthal-Holz (DE). CASPERS, Norbert [DE/DE]; St. Maternus-Eck 14a, 51515 Kürten-Bechen (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER CROPSCIENCE AG; Legal and Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW. ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- Erklärung gemäß Regel 4.17:**
— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW. ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR DETECTING PHOTOSYNTHESIS INHIBITION

A2

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUM NACHWEIS DER PHOTOSYNTHESE-HEMMUNG

- (57) Abstract: A method, system and test strip for detecting photosynthesis inhibition in substances by providing cells or parts of cells with an intact photosystem, inserting said cells or cell parts into a planar layer, placing the test substance on the planar layer or inside the planar layer, exciting the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by an exciting light source, measuring the luminescence of the cells or cell parts in the planar layer by means of a detector and associating the detector signal with the degree of photosynthesis inhibition.
- (57) Zusammenfassung: Verfahren, System und Teststreifen zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen durch Bereitstellung von Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem, Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine planare Schicht, Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht, Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine Anregungslichtquelle, Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor und Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.

WO 03/006684 A2

Vorrichtung und Verfahren zum Nachweis der Photosynthese-Hemmung

Die Inhibierung der Photosynthese von Pflanzen durch herbizid wirksame Substanzen ist ein wichtiger Parameter für die ökotoxikologische Bewertung von Substanzen einerseits und für die Suche nach herbizid wirksamen Substanzen in der Pflanzenschutzforschung andererseits. Leistungsfähige Messtechniken für die rasche Erfassung der Photosynthese-hemmenden Wirkung besitzen daher bei der ökotoxikologischen Bewertung von Substanzen und als Screeningverfahren für die Suche nach neuen Pflanzenschutzwirkstoffen eine große Bedeutung.

Zur Prüfung auf Photosynthese-hemmende Wirkung sind verschiedene Tests sowohl an höheren Pflanzen wie auch an Mikroalgen bekannt. Die bekannten Messprinzipien beruhen dabei u. a. auf der Chlorophyll-Fluoreszenz oder auf der Messung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion (B. Hock, C. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbizide, Georg Thieme Verlag, 1995, 54 u. 112-114; D. Merz, M. Geyer, D. A. Moss, H.-J. Ache, Fresenius J. Anal. Chem., 1996, 354: 299-305). Diese den Stand der Technik repräsentierenden Verfahren weisen durchweg Begrenzungen auf, die Hochdurchsatzmessungen, wie sie beim Wirkstoffscreening durchgeführt werden, Miniaturisierungen z.B. Hochparallelisierung oder eine direkte Kopplungen mit analytischen Separationstechniken zur Wirkungsdetektion in Stoffgemischen nicht zulassen.

Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz ist als Standard-Verfahren zur Untersuchung des Photosynthese-Prozesses etabliert. Die hier angewendeten Verfahren arbeiten mit Fluorimetern, die wegen ihrer auf Sonden- oder Küvetten-Messungen beruhenden Methodik lediglich serielle Messungen zulassen und damit für Hochdurchsatz-Anwendungen nicht geeignet sind. Darüber hinaus lassen sich solche Verfahren auch nur schwer miniaturisieren. Typische Instrumente für diese Technik werden u. a. von den nachfolgend genannten Herstellern angeboten: ADC BioScientific Ltd., Hansatech Instruments, Heinz Walz GmbH, Qubit Systems Inc.

- 2 -

- Beim *DF-Algentest* werden Wasserproben mit Grünalgen versetzt und anschließend luminometrisch vermessen (Methoden der biologischen Wasseruntersuchung, Band 2: Biologische Gewässeruntersuchung, G. Fischer Verlag, 1999, Seite 386-388). Dabei wird zunächst die Abklingkinetik für die zeitverzögerte Lumineszenz des Photosynthese-Pigmentkomplexes ermittelt. Durch Vergleich mit der entsprechenden Abklingkinetik für eine unbelastete Referenzprobe wird auf die Gegenwart von Photosynthese-hemmenden Substanzen geschlossen. Dieses Verfahren kann Proben lediglich seriell bearbeiten und ist daher für Hochdurchsatzmessungen nicht geeignet.
- 10 Eine weitere Einschränkung betrifft das für den *DF-Algentest* notwendige Probenvolumen, das bedingt durch die Dimensionierung der Messapparatur in der Größenordnung von Millilitern liegt. Eine Miniaturisierung ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Weiterhin werden Stoffgemische, wie sie für reale Proben typisch sind, von diesem Verfahren lediglich summarisch erfasst. Auf Grund möglicher Interaktionen zwischen den Probeninhaltsstoffen besteht das Risiko für falsch positive Resultate.
- 20 Bekannt sind auch Tests an höheren Pflanzen (siehe z.B. W. Bilger, U. Schreiber, M. Bock, Oecologia 102, 1995, S. 425-432). Diese Tests machen eine Aussage zur Photosynthese-Hemmung über ein Fluoreszenz-Messverfahren. Auch hier stellt die Geometrie der Testvorrichtung ein Hindernis für die massive Parallelisierung und die Miniaturisierung dar. Stoffgemische können wieder nur summarisch beurteilt werden.
- 25 In EP 588 139 A1 wird ein Test für Stoffgemische beschrieben. Die biologische Wirkung der Substanzen in einem Stoffgemisch wird geprüft durch eine Kombination von chromatographischer Auftrennung des Stoffgemisches in die zu testenden Substanzen in chromatographische Zonen und einem anschließenden Test der biologischen Wirkung (Toxizität) der einzelnen aufgetrennten Fraktionen. Bei dem Test der biologischen Wirkung werden die einzelnen Fraktionen in Kontakt mit Leuchtmikroorganismen gebracht, die durch eine lokale Änderung ihrer Bio-
- 30

lumineszenz an den einzelnen Fraktionen die biologische Wirkung dieser Fraktion anzeigen.

5 Die Möglichkeit der Parallelisierung und Miniaturisierung von Wirkungstests wird in EP 1 043 582 A2 beschrieben. Nach dem in EP 1 043 582 A2 offenbarten Verfahren wird eine Sensorschicht eingesetzt, die aus einer diffusionskontrollierenden Matrix und darin suspendierten Wirkungssensoren besteht. Beim Kontakt dieser Sensorschicht mit Proben wird die biologische Aktivität der Prüfsubstanzen durch optische Signale angezeigt.

10

Die Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Erfassung von Photosynthese-hemmenden Substanzen bereitzustellen, das einen gegenüber dem Stand der Technik deutlich höheren Probendurchsatz und eine Miniaturisierung ermöglicht.

15

Die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe besteht in einem Verfahren zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen enthaltend die Schritte

20

- Bereitstellung von Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem,
- Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine planare Schicht,
- Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht,
- Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine Anregungslichtquelle,
- Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor
- Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.

25

30

Die Zellen können aus Algen, Mikroalgen, Bakterien insbesondere Cyanobakterien mit einem Photosynthesesystem, Pflanzenzellkulturen oder Pflanzenhomogenisat

- 4 -

stammen. Das Verfahren arbeitet auch mit Zellen, die in ihrer Vitalität geschädigt sind, solange ein intaktes Photosystem II (PS II) vorliegt.

5 Die Zellen können auch aus selektionierten Mutanten oder aus gentechnisch veränderten Organismen stammen.

Die planare Schicht ist vorzugsweise eine Gelschicht. Die planare Schicht hat vorzugsweise eine Dicke im Bereich von 0,1 mm bis 10 mm. Das Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine planare Schicht kann durch Einbettung z.B. von Grünalgen 10 in Agarose- oder Acrylatgele oder andere Gelbildner oder viskose Medien erfolgen.

Das Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht erfolgt zum Beispiel mittels Spritzentechniken oder durch Pin-Tools oder geeignete Drucktechniken (Jetsysteme etc.), bevorzugt in Form von Spots.

15 Bei der Lumineszenz handelt es sich um Fluoreszenz und/oder Phosphoreszenz (zeitverzögerte Lumineszenz). Die Messung der Phosphoreszenz bietet im Vergleich zur Fluoreszenzmessung Vorteile, da kein Aufwand für die Diskriminierung von Anregung und Emission entsteht. Andererseits besitzt die Fluoreszenzmessung den Vor-20 teil größerer Nachweisempfindlichkeit.

Als Anregungslichtquelle eignen sich sowohl Weißlichtquellen, z.B. Halogenlicht oder Leuchtstoffröhren wie auch Lichtquellen, die in einem schmalen Spektralbereich emittieren, z.B. Leuchtdioden. Als Anregungslichtquelle kann auch Tageslicht 25 dienen. Die Anregung kann kontinuierlich oder in einem gepulsten Modus (Pulsmodulationstechnik) erfolgen.

Die Detektion erfolgt mit Instrumenten, die zu einer Abbildung der emittierten Lumineszenz im Wellenlängenbereich von > 680 nm mit hinreichender Empfindlichkeit in der Lage sind (z.B. Vidicon-System, CCD-Kamera, Scanner, Phosphorimager, photographischer Film).

Es können auch zeitaufgelöste Lichtmessungen gegebenenfalls zusammen mit gepulster Anregung und Korrelation von Anregung und Messung durchgeführt werden.

- 5 Unabhängig von der Anregungsbelichtung kann eine zusätzliche Belichtung oder eine Dunkelphase zur Steuerung der Photosyntheseaktivität eingesetzt wird.

Photosynthese-hemmende Prüfsubstanzen, die auf oder in die erfindungsgemäße planare Schicht aufgebracht werden, beeinflussen das Lumineszenzverhalten des
10 Photosynthese-Pigment-Komplexes. Auf die planare Schicht aufgegebene Spots von Photosynthese-Hemmern wie Atrazin lassen sich z.B. durch signifikante Schwächung der zeitverzögerten Lumineszenz (Phosphoreszenz) mit Video-Imaging-verfahren einfach und für eine große Zahl von Spots gleichzeitig über ihre Wirkung nachweisen. Alternativ hierzu kann auch die verstärkte Fluoreszenz der Photo-
15 pigmenta bei Inhibierung des Photosynthesesystems II zur Abbildung der PS II-aktiven Substanzspots dienen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein System zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen nach dem erfindungsgemäßen Ver-
20 fahren, enthaltend

- eine planare Schicht mit Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem,
- Mittel zum Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die
25 planare Schicht,
- Anregungslichtquelle zur Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht,
- Detektor zur Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht,
- 30 - Auswertemittel zur Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.

- 6 -

Die Mittel zum Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht können z.B. Spritzenysteme, Stahlnadeln (Pin-Tools) oder geeignete Druckstempel sowie Jet-Systeme sein.

5

Die Auswertung kann visuell oder mittels geeigneter Bildverarbeitungstechniken erfolgen.

10 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Teststreifen oder Sensor-Chip zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren enthaltend eine planare Schicht mit Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem, wobei nach dem Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht, und nachfolgender Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine 15 Anregungslichtquelle, und Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor, aus dem Detektorsignal der Grad der Photosynthese-Hemmung bestimmbar ist.

20 Die planare Schicht des Teststreifens oder Sensor-Chips besteht bevorzugt aus Grünalgen in Agarose- oder Acrylatgelen. Auf diese Weise lassen sich stabile Detektionsschichten herstellen, die ihre Funktion als Testsystem für die Photosynthese-Hemmung auch bei Lagerung über längere Zeiträume beibehalten.

25 Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine hohe Miniaturisierung und Parallelisierung des Nachweisverfahrens für Photosynthese-hemmende Substanzen. Durch die Parallelisierung kann ein hoher Probendurchsatz erzielt werden. Durch die Miniaturisierung kann ein erheblich geringerer Verbrauch an Materialien erreicht werden.

30 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, mehrere tausend Substanzspots auf einer Fläche von 9 cm * 12 cm aufzubringen und damit neben der Parallelis-

- 7 -

sierung einen Miniaturisierungsgrad von < 10 ng Prüfsubstanz in weniger als 500 nl Testvolumen zu erreichen.

Die ortsauflösende Wirkungserfassung erlaubt es, Photosynthese-hemmende Substanzen als Komponenten von Stoffgemischen störungsfrei in Dünnschichtchromatogrammen oder Elektropherogrammen zu identifizieren, indem zunächst das Stoffgemisch einer chromatographischen oder elektrophoretischen Trennung auf einer Dünnschichtchromatographieplatte oder einer Elektrophoreseschicht unterworfen wird und anschließend nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gemäß Anspruch 15 die Photosynthese-hemmende Wirkung der Fraktionen untersucht wird.

Die ortsauflösende Wirkungserfassung erlaubt es auch, Photosynthese-hemmende Substanzen auf verschiedene Orte eines Trägers aufzugeben und Photosynthese-hemmende Wirkung dieser Spots mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zu untersuchen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in der Wirkstoffforschung zur Optimierung von Photosynthese-Hemmern eingesetzt werden. Ein weiteres Einsatzfeld bildet zum Beispiel die spezifische Messung der auf Schadstoffe zurückzuführenden herbiziden Aktivität in Abwässern und Umweltproben.

Figuren und Beispiele**Beispiel 1**

5 In Beispiel 1 wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren der spezifische Nachweis photosynthesehemmender Substanzen mittels induzierter Fluoreszenz in dem erfindungsgemäßen Schichtsystem gezeigt.

10 Zur Detektion der Photosynthese-Hemmung wurde eine dünne Agaroseschicht (ca. 4 mm Schichthöhe), in die Grünalgen (*Scenedesmus subspicatus*) suspendiert worden waren, eingesetzt.

Die Grünalgen wurden folgendermaßen angezüchtet:

15 Aus einer Stammkonserve *Scenedesmus subspicatus* werden die Algen in einen sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben, der 50 ml Anzucht-Medium enthält überimpft. Anschließend wird die Lösung bei 23°C und bei 125 rpm in einem mit Leuchtstoffröhren ausgerüsteten Klimaschrank unter Lichteinwirkung für 7 Tage inkubiert.

Das Anzucht-Medium enthält:

20 58 mg/l Natriumcarbonat
496 mg/l Natriumnitrat
39 mg/l Kaliumhydrogenphosphat
75 mg/l Magnesiumsulfatheptahydrat
36 mg/l Calciumchloriddihydrat
25 10 mg/l Titriplex III
3 mg/l Zitronensäure

und wird mit Hilfe von 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf pH 7,5 ± 0,2 eingestellt. Das Medium wird vor Gebrauch bei 121°C für 20 min autoklaviert.

- 9 -

Herstellung der Algenschicht:

25 ml der Algensuspension (optische Dichte ca. 2 mAU) werden bei Temperaturen unter 40°C mit 15 ml 1 % Agarose MP-Lösung (Boehringer Mannheim GmbH Art. Nr. 1388983) homogen gemischt. Diese Suspension wird vor dem Erkalten in eine 5 Single Well-Platte (Nalge Nunc, Omni Tray Single Well 86 x 128 mm) gegeben. Dort bildet sich beim Abkühlen eine Gelschicht mit gleichförmig suspendierten Algen aus. Diese Detektionsschicht kann sofort oder auch nach mehreren Wochen Lagerung zur Messung der Photosynthese-Hemmwirkung eingesetzt werden.

10 Substanztransfer auf Detektionsschicht und Inkubation:

Für den erfindungsgemäßen parallelen Wirkungstest wurden Testsubstanzen aus einer Mikrotiterplatte mit einem 96-fach Pintool (Nalge Nunc 96 Pin Replicator) auf die Algenschicht gestempelt. Die Probenbelegung der Mikrotiterplatte (siehe Tabelle 1) legt damit auch die Position der jeweiligen Substanz auf der Algenschicht. Dabei 15 lagen die Testsubstanzen in der Mikrotiterplatte als DMSO-Lösung (100 µMol Substanz in 100 µl je Well) vor. Mit dem Pin Tool wurden jeweils ca. 0,5 µl Probe-lösung je Pin auf die Detektionsschicht übertragen. Vor der Fluoreszenzmessung wurde die bestempelte Detektionsschicht bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert.

20

- 10 -

Tabelle 1: Parallelle Detektion der Wirkung von Substanzen durch Fluoreszenzimaging auf 96er-Mikrotiterplatte mit Algenschicht

Position	Substanz	Wirkung
A1		
B1	Glyphosat	
C1	Thidiazuron	
D1	Pendimethalin	
E1	Fluazifop-P-butyl	
F1	Thifensulfuron-methyl	
G1	Quinmerac	
H1	Ioxynil	
A2	MCPA	
B2	Tebuthiuron	X
C2	Diuron	X
D2	Mefenacet	
E2	Cyanazin	X
F2	Oxadiazon	
G2	Terbutylazin	X
H2	Diflufenican	
A3	Dicamba	
B3	Acifluorfen	
C3	Ametryn	X
D3	Prometon	X
E3	Prometryn	X
F3	Sulfometuron-methyl	
G3	-	
H3	Metribuzin	X
A4	Pyrazolat	
B4	Norflurazon	

- 11 -

Position	Substanz	Wirkung
C4	Linuron	X
D4	EPTC	
E4	Metazachlor	
F4	Metamitron	X
G4	Naproamid	
H4	Bentazon	
A5	Pyridat	
B5	-	
C5	Pretilachlor	
D5	Sethoxydim	
E5	Isoproturon	X
F5	Nicosulfuron	
G5	Bromacil	X
H5	Haloxylfop-P-methyl	
A6	Phenmedipham	X
B6	Alachlor	
C6	-	
D6	Thiobencarb	
E6	Difenoquat	
F6	Imazapyr	
G6	Metsulfuron-methyl	
H6	Metolachlor	
A7	Propanil	X
B7	Clopyralid	
C7	Bensulfuron-methyl	
D7	-	
E7	Atrazin	X
F7	Simazin	X
G7	-	

- 12 -

Position	Substanz	Wirkung
H7	Propyzamid	
A8	Quinchlorac	
B8	Diquat	
C8	Bifenoxy	
D8	Glufosinat	
E8	Butylat	
F8	Ethalfluralin	
G8	Sulcotrione	
H8	Tralkoxydim	
A9	Amitrol	
B9	-	
C9	Butachlor	
D9	Hexazinon	X
E9	Alloxydim	
F9	Chlorimuron-ethyl	
G9	-	
H9	Mecoprop	
A10	Fluometuron	X
B10	Fenoxaprop-P-ethyl	
C10	Desmedipham	X
D10	Primisulfuron	
E10	Diallat	
F10	Asulam	
G10	-	
H10	Ethofumesat	
F12	50 ng Metamitron	Referenz PSII-Hemmung
G12	125 ng Metamitron	Referenz PSII-Hemmung
H12	250 ng Metamitron	Referenz PSII-Hemmung

Parallele Detektion der Wirkung durch Fluoreszenzimaging:

Zur Aufnahme des Fluoreszenz-Bildes wurde ein Videoimaging System (Molecular Light Imager NightOWL von PerkinElmer Life Sciences) eingesetzt. Für die 5 Messung wurde die Single Well-Platte auf einen Leuchttisch plaziert, dessen Weißlichtquelle mit einem Filter (Omega 475 RDF 40) auf Wellenlängen unterhalb von 475 nm begrenzt wurde. Zur selektiven Erfassung des Fluoreszenzlichts wurde das Kameraobjektiv mit einem Filter ausgerüstet, der Licht oberhalb 680 nm passieren lässt (Andover P/N: 680FS10-50). Die Fluoreszenzanregung und die Kameraaufnahme erfolgten simultan für einen Zeitraum von 1 Sekunde. Die Auswertung des Fluoreszenzbildes erfolgte visuell am Bildschirm des Videoimaginingsystems. Zur Dokumentation wurden TIFF-Files mit geeigneten Grafikprogrammen formatiert und beschriftet (Adobe Photoshop 5.0, MS Powerpoint 97).

15 **Ergebnisse:**

Das Fluoreszenz-Image zeigt 22 helle Spots (siehe Figur 1). Die dort deponierten Substanzen bewirken auf Grund ihrer Wechselwirkung mit dem Photosystem eine Steigerung der Fluoreszenz. Auf den Positionen F12,G12, H12 war als Referenzsubstanz Metamitron, ein bekannter Photosynthesehemmer, mit den Mengen 50 ng, 20 125 ng und 250 ng aufgetragen worden. Alle in diesem Parallel assay aufgefallenen Substanzen und in Tabelle 1 mit X gekennzeichneten Substanzen sind als Hemmstoffe des Photosystems II bekannt.

Beispiel 2

25

In Beispiel 2 wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren der spezifische Nachweis photosynthesehemmender Substanzen mittels Phosphoreszenz in dem erfindungsge-mäßen Schichtsystem gezeigt.

30

Die Algenschicht wurde analog Beispiel 1 hergestellt.

- 14 -

Es wurden die gleichen Testsubstanzen wie in Beispiel 1 und in identischer Positionierung auf die Algenschicht aufgebracht. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 15 Minuten.

5 Parallele Detektion der Wirkung durch Phosphoreszenzimaging:

Zur Aufnahme des Phosphoreszenz-Bildes wurde ein Videoimaging System (Molecular Light Imager NightOWL von PerkinElmer Life Sciences) eingesetzt. Für die Messung wurde die NUNC-Platte auf einen Leuchttisch plaziert, der mit einer Weißlichtquelle ausgerüstet war. Zur Erfassung des Phosphoreszenzlichts wurden
10 keine Filter vor dem Kameraobjektiv eingesetzt. Zur Phosphoreszenzanregung wurde die Algenschicht für 90 Sekunden belichtet. Nach einer Wartezeit von 15 Sekunden erfolgte die Kameraaufnahme mit einer Aufnahmezeit von 30 Sekunden. Die Auswertung des Phosphoreszenzbildes erfolgte visuell am Bildschirm des Videoimagingsystems. Zur Dokumentation wurden TIFF-Files mit geeigneten
15 Grafikprogrammen formatiert und beschriftet (Adobe Photoshop 5.0, MS Powerpoint 97).

Ergebnisse:

Das Phosphoreszenz-Image zeigt 22 dunkle Spots (siehe Figur 2). Die dort
20 deponierten Substanzen bewirken auf Grund ihrer Wechselwirkung mit dem Photosystem ein rascheres Abklingen der Phosphoreszenz. Auf den Positionen F12,G12,
H12 war als Referenzsubstanz Metamitron, ein bekannter Photosynthesehemmer, mit
den Mengen 50 ng, 125 ng und 250 ng aufgetragen worden. Die Resultate stimmen
gut mit den Ergebnissen des Fluoreszenzimaging überein (siehe auch Beispiel 1).
25 Alle in diesem Parallel assay aufgefallenen Substanzen sind als Hemmstoffe des
Photosystems II bekannt.

- 15 -

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen enthaltend die Schritte

5

- Bereitstellung von Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem,
- Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine planare Schicht,
- Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht,
- Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine Anregungslichtquelle,
- Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor und
- Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen aus Algen, Mikroalgen, Cyanobakterien, anderen Bakterien mit einem Photosynthesesystem, Pflanzenzellkulturen, Pflanzenhomogenisat, selektionierten Mutanten oder aus gentechnisch veränderten Organismen stammen.

15

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Zellen um avitale Zellen handelt, bei denen das Photosynthese II-System noch intakt ist.

20

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix der planaren Schicht bevorzugt aus Agarose oder Acrylat, oder anderen Gelbildnern oder anderen viskosen Medien besteht.

25

30

- 16 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die planare Schicht eine Dicke im Bereich von 0,1 mm bis 10 mm hat.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Einbringen der Zellen oder der Zellteile in die planare Schicht durch Einbettung von Grünalgen in Agarose erfolgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht durch Pin-Tools, Spritzenysteme oder geeignete Drucktechniken in Form von Spots erfolgt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Lumineszenz um Fluoreszenz und/oder Phosphoreszenz handelt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungslichtquelle eine Weißlichtquelle oder aber eine Lichtquelle mit enger spektraler Verteilung (z.B. Leuchtdioden) darstellt und für die kontinuierliche Anregung und/oder für Pulsmodulationstechniken eingesetzt wird.
25. 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungslichtquelle Tageslicht ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor auch in einem Wellenlängenbereich von > 680 nm empfindlich ist und bildgebende Eigenschaften hat.
30. 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Detektor z.B. ein Vidicon-System, eine CCD-Kamera, ein Scanner, ein Phosphorimager oder ein photographischer Film eingesetzt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass zeitaufgelöste Lichtmessungen gegebenenfalls zusammen mit gepulster Anregung und Korrelation von Anregung und Messung durchgeführt werden.
5
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass unabhängig von der Anregungsbelichtung eine zusätzliche Belichtung oder eine Dunkelphase zur Steuerung der Photosyntheseaktivität eingesetzt wird.
- 10 15. Verfahren zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen enthaltend die Schritte
 - Bereitstellung von Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem,
 - Bereitstellung einer Dünnschichtchromatographieplatte oder einer Elektrophoreseschicht oder eines anderen Trägers mit darauf deponierten Substanzzonen,
15
 - Einbringen der Zellen oder der Zellteile in eine planare Schicht,
 - Aufbringen der planaren Schicht mit den Zellen oder Zellteilen auf die bereitgestellte Dünnschichtchromatographieplatte oder Elektrophoreseschicht
 - 20 oder den anderen Träger,
 - Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine Anregungslichtquelle,
 - Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor und
 - 25 - Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzzonen durch chromatographische oder elektrophoretische Trennung erzeugt worden sind.
30

- 18 -

17. System zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen, enthaltend
 - eine planare Schicht mit Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem,
 - Mittel zum Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht oder auf einen Träger, der die planare Schicht trägt,
 - Anregungslichtquelle zur Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht,
 - Detektor zur Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht,
 - Auswertemittel zur Zuordnung des Detektorsignals zum Grad der Photosynthese-Hemmung.
18. System nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zum Aufbringen der Prüfsubstanz auf die planare Schicht oder in die planare Schicht oder auf den Träger der planaren Schicht ein Spritzen-System, ein Pin-Tool oder ein geeigneter Druckstempel sowie ein Jet-System sein kann.
19. System nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass als Detektor z.B. ein Vidicon-System, eine CCD-Kamera, ein Scanner, ein Phosphor-imager oder ein photographischer Film eingesetzt wird.
20. System nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung mittels Bildverarbeitung oder visuell erfolgt.
21. System nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass sich der Träger für die planare Schicht eine Dünnschichtchromatographieplatte oder einer Elektrophoreseschicht mit darauf deponierten Substanzzonen ist.

- 19 -

22. Teststreifen oder Sensor-Chip zum Nachweis der Photosynthese-hemmenden Wirkung von Substanzen enthaltend eine planare Schicht mit Zellen oder Zellteilen mit einem intakten Photosystem, wobei nach dem Aufbringen der Prüfsubstanz auf den Teststreifen oder Sensor-Chip, und nachfolgender Anregung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht durch eine Anregungslichtquelle, und Messung der Lumineszenz der Zellen oder der Zellteile in der planaren Schicht mit einem Detektor, aus dem Detektorsignal der Grad der Photosynthese-Hemmung der Prüfsubstanz bestimmbar ist.
- 5
- 10
23. Teststreifen oder Sensor-Chips nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die planare Schicht des Teststreifen oder Sensor-Chips aus Grünalgen in Agarose- oder Acrylatgelen oder anderen Gelmatrices oder viskosen Lösungen besteht.
- 15
24. Teststreifen oder Sensor-Chips nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Zellen um avitale Zellen handelt, bei denen das Photosynthese II-System noch intakt ist.

- 1/2 -

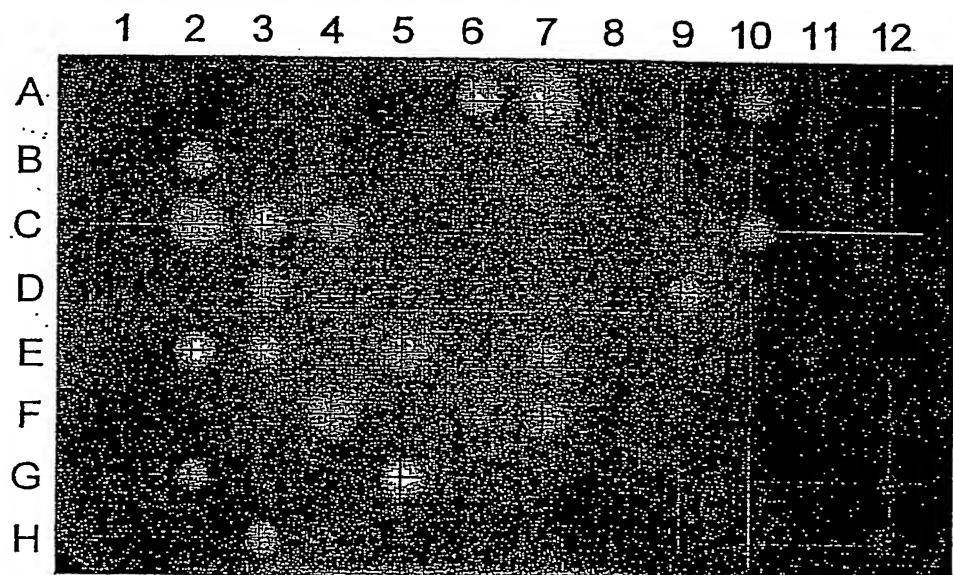


fig. 1

06082

- 2/2 -

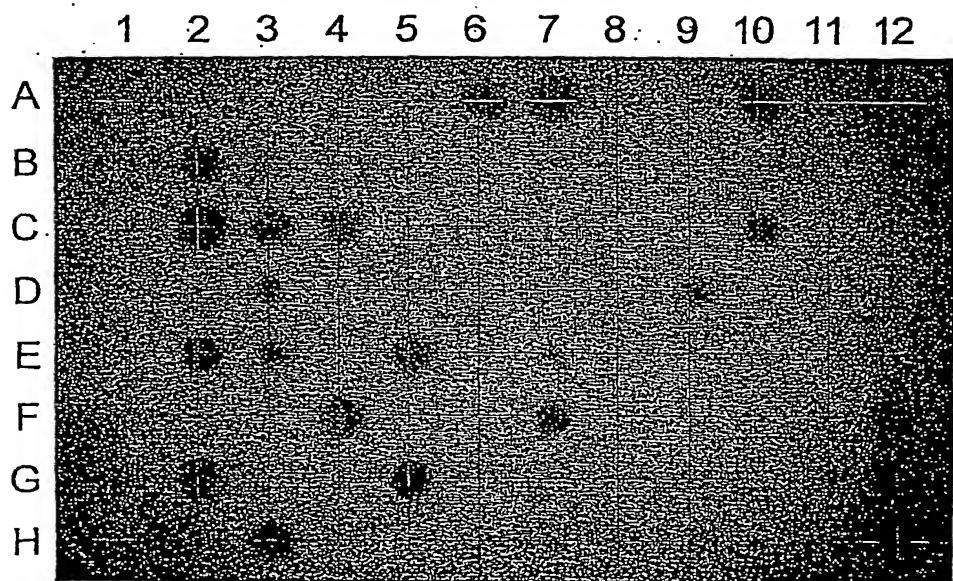


fig. 2

06076